

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 09 856.9

Anmeldetag: 06. März 2003

Anmelder/Inhaber: Consortium für elektrochemische Industrie GmbH,
81379 München/DE

Bezeichnung: Verfahren zur fermentativen Herstellung
von S-Adenosylmethionin

IPC: C 12 P 19/40

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. Januar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Klostermeyer

Verfahren zur fermentativen Herstellung von S-Adenosylmethionin

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von S-Adenosylmethionin unter Verwendung eines Bakterienstammes, der S-Adenosylmethionin-Synthetase überproduziert.

S-Adenosylmethionin (SAM) ist der wichtigste Methylgruppen-donor im Stoffwechsel und findet im Pharmabereich Verwendung bei der Behandlung von Depressionen, Erkrankungen der Leber und Arthritis. Beschriebene Verfahren zur SAM-Herstellung umfassen die Anzucht von Hefen (Schlenk F. und DePalma R.E., J. Biol. Chem. 1037-1050 (1957), Shiozaki S. et al., Agric. Biol. Chem. 53, 3269-3274 (1989)) in Gegenwart der Vorstufe L-Methionin und die chromatographische Aufreinigung des gebildeten SAM nach Extraktion aus dem Zelllysats (US4562149). Ein Nachteil dieses Verfahrens ist vor allem die aufwändige Aufreinigung des gebildeten SAM, da die Zellen zuerst aufgebrochen und SAM von allen anderen Zellbestandteilen wie Aminosäuren, Zuckern, Lipiden, Nukleotiden, Proteinen, Cofaktoren und anderen hoch- und niedermolekularen Verbindungen abgetrennt werden muß. Aus diesem Grund würde die Entwicklung eines Verfahrens zur fermentativen Produktion von SAM gegenüber bestehenden Verfahren einen deutlichen Vorteil aufweisen, wenn eine selektive Sekretion des gebildeten SAM in den Kulturüberstand und damit eine Vereinfachung des Aufreinigungsverfahrens möglich wäre. Im Kulturüberstand befinden sich nur wenige Substanzen, weshalb eine Sekretion von SAM schon einen ersten Aufreinigungsschritt darstellen und die weitere Aufreinigung deutlich erleichtern würde.

In GB1436509 ist ein Verfahren zur extrazellulären Produktion von SAM durch Hefen, wie zum Beispiel *Candida tropicalis*, beschrieben. Ein Nachteil dieses Verfahrens liegt darin begründet, daß die verwendeten Produktionsstämme ungewöhnliche Pilze sind, die nicht den GRAS-Status (generally recognized as safe) aufweisen, sondern zum Teil sogar als pathogene Organismen

einzustufen sind. Außerdem sind diese Organismen genetischen Methoden schwer zugänglich und ihr Stoffwechsel ist weitgehend unbekannt. Damit fehlen zwei wesentliche Voraussetzungen für die Verbesserung durch metabolic engineering. Bakterien dagegen sind genetisch leicht zugänglich, der Stoffwechsel ist von vielen Arten gut erforscht und es gibt viele apathogene Arten, die den GRAS-Status aufweisen. Ein Verfahren, bei dem SAM durch Bakterien produziert wird, wäre daher sehr wünschenswert. Eine extrazelluläre Produktion von SAM in Bakterien ist bisher jedoch nicht bekannt.

Die Synthese von S-Adenosylmethionin wurde besonders intensiv im Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) untersucht (Greene, R.C., Biosynthesis of Methionine in: Neidhardt F.C., *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and molecular biology, Second Edition, ASM Press, Washington DC (1996), Seiten 542-560 und darin enthaltenen Referenzen). Die Synthese von SAM erfolgt im Anschluß an die aufwändige und hochregulierte Synthese von L-Methionin in einem Schritt aus L-Methionin und ATP. Dabei werden alle drei Phosphatgruppen aus ATP freigesetzt unter Entstehung von anorganischem Phosphat und Pyrophosphat. Diese Reaktion wird durch das Enzym S-Adenosylmethionin-Synthetase (EC 2.5.1.6, Methionin-Adenosyltransferase, SAM-Synthetase) katalysiert, das in *E. coli* durch das Gen *metK* codiert wird. Dieses Enzym wurde biochemisch und genetisch eingehend charakterisiert und zeigt eine sehr strenge Endprodukthemmung (Feedback-Regulation). Das heißt, die Aktivität des Enzyms ist in Anwesenheit eines Überschusses an SAM stark gehemmt (Markham et al., J. Biol. Chem., 9082-9092 (1980)). Diese Feedback-Regulation verhindert eine energieverbrauchende unnötige Synthese von SAM und einen zu hohen, für die Zelle möglicherweise schädlichen SAM-Spiegel in der Zelle, steht aber auch einer fermentativen Überproduktion von SAM im Weg. SAM-Synthetasen anderer Organismen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Methanococcus janaschii*, Ratte) wurden ebenfalls untersucht, sie zeigen ebenfalls eine Hemmbarkeit durch SAM, die jedoch nicht so ausgeprägt wie bei der SAM-Synthetase von *E. coli* ist (Park et al., Bioorgan. Med. Chem., 2179-2185

(1996); Lu and Markham, J. Biol. Chem., 16624-16631 (2002); Oden und Clarke, Biochemistry, 2978-2986 (1983).

Im Gegensatz zu anderen Organismen (z.B. Hefe) existiert in Bakterien kein Transportsystem für SAM und Bakterien können diese Substanz daher nicht aus dem Medium aufnehmen, weshalb die SAM-Synthetase ein essentielles Enzym ist. Die SAM-Synthetase von E. coli konnte überproduziert werden, was zu einer Zunahme der Enzym-Menge in der Zelle führte (Markham et al., J. Biol. Chem., 9082-9092 (1980)). Es ist jedoch nicht bekannt, daß eine Überproduktion auch zu einer Zunahme der SAM-Menge in der Zelle führt. Dies ist auch nicht zu erwarten, da eine Anhäufung von SAM in der Zelle durch oben erwähnte Feedback-Regulation der SAM-Synthetase verhindert wird. Die intrazelluläre Produktion von SAM ist also durch die Regulation der Aktivität der SAM-Synthetase limitiert.

Dagegen konnte durch Überproduktion der SAM-Synthetase aus der Rattenleber der intrazelluläre SAM-Spiegel in E. coli deutlich erhöht werden (Alvarez et al., Biochem. J., 557-561 (1994); EP0647712A1). Dies ist möglich, weil diese SAM-Synthetase keiner strengen Feedback-Regulation unterliegt wie das homologe Enzym aus E. coli und die Regulation in dem Bakterium so umgangen wird. Jedoch wurde auch hier keine extrazelluläre Akkumulation von SAM beobachtet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur fermentativen Produktion von SAM mittels Bakterien zur Verfügung zu stellen, welches die Aufreinigung von SAM deutlich vereinfacht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass ein Bakterienstamm, der aus einem Ausgangsstamm mit einer SAM-Synthetase erhältlich ist und eine im Vergleich zu dem Ausgangsstamm verstärkte Aktivität der SAM-Synthetase aufweist, in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei der Bakterienstamm SAM in das Kulturmedium ausscheidet und das SAM vom Kulturmedium abgetrennt wird.

Angesichts der Tatsache, daß die SAM-Synthetase in Bakterien, vor allem in E. coli, wie oben beschrieben einer strengen Feedback-Regulation unterliegt, ist es überraschend, daß bei Steigerung der Aktivität eine Zunahme der SAM-Produktion zu beobachten ist. Insbesondere ist es völlig unerwartet, daß das überproduzierte SAM in den Kulturüberstand ausgeschieden wird. Wie oben beschrieben existieren keine Beispiele, daß fermentativ hergestelltes SAM von Bakterien in den Kulturüberstand abgegeben wird. Insbesondere ist in Bakterien kein Transportsystem für SAM bekannt und SAM kann auch nicht aus dem Medium aufgenommen werden. Eine passive Diffusion nach außen ist bei einem derart großen und außerdem geladenen Molekül wie SAM extrem unwahrscheinlich. Daher ist die extrazelluläre Anreicherung von SAM für den Fachmann völlig überraschend.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens ergeben sich aus der gesteigerten SAM-Produktion und der erleichterten Aufarbeitung aus dem Kulturüberstand. Dieses Verfahren ermöglicht eine gesteigerte SAM-Produktion auch durch SAM-Synthetasen, die normalerweise einer strengen Produkthemmung unterworfen sind, welche eine intrazelluläre Anhäufung von SAM verhindert, dadurch daß das produzierte SAM in den Kulturüberstand sekretiert wird und damit die SAM-Synthetase nicht mehr hemmt.

Darüberhinaus wurde überraschend festgestellt, dass im Gegensatz zum Stand der Technik in dem erfindungsgemäßen Verfahren anstelle von L-Methionin als Vorläufer auch D,L-Methionin verwendet werden kann. Letzteres ist erheblich kostengünstiger und erlaubt somit eine drastische Ersparnis bei den Herstellungskosten.

Die Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass ein Bakterienstamm, der aus einem Ausgangsstamm mit einer SAM-Synthetase erhältlich ist und eine im Vergleich zu dem Ausgangsstamm verstärkte Aktivität der SAM-Synthetase aufweist, in einem Kulturmedium kultiviert wird, welches D,L-Methionin enthält, wobei der Bakterienstamm

SAM in das Kulturmedium ausscheidet und das SAM vom Kulturmedium abgetrennt wird.

Vorzugsweise wird im erfindungsgemäßen Verfahren als SAM-Synthetase ein Protein umfassend die Sequenz SEQ ID NO: 1 oder funktionelle Varianten mit einer Sequenzähnlichkeit zu SEQ ID NO: 1 größer 40 %, eingesetzt.

Vorzugsweise ist die Sequenzähnlichkeit zu SEQ ID NO: 1 größer 60 %, besonders bevorzugt ist die Sequenzähnlichkeit zu SEQ ID NO: 1 größer 80 %.

In der vorliegenden Erfindung beziehen sich alle erwähnten Homologiewerte auf Ergebnisse, die mit dem Algorithmus BESTFIT (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GLG) Madison, Wisconsin) erhalten werden. Die Erfindung betrifft auch die vorgenannten SAM-Synthetasen.

Vorzugsweise wird im erfindungsgemäßen Verfahren ein Gen für eine der vorgenannten SAM-Synthetasen, im Folgenden auch als *metK*-Gen bezeichnet, verwendet. Es handelt sich dabei um ein Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder um eine funktionelle Variante dieses Gens.

Unter einer funktionellen Variante ist im Sinne der vorliegenden Erfindung eine DNS-Sequenz zu verstehen, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Sequenz ableitet, wobei die enzymatische Aktivität der durch das Gen codierten SAM-Synthetase erhalten bleibt.

Unter einer verstärkten Aktivität ist im Sinne der vorliegenden Erfindung vorzugsweise zu verstehen, dass die Aktivität der SAM-Synthetase in einem erfindungsgemäß verwendeten Bakterienstamm im Vergleich zum jeweiligen Ausgangsstamm mindestens um den Faktor 2, bevorzugt mindestens um den Faktor 5 gesteigert ist.

Bakterienstämme, die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden und eine gegenüber einem Ausgangsstamm erhöhte SAM-Synthetase Aktivität aufweisen, können mit Standardtechniken der Molekularbiologie aus einem Ausgangsstamm, in der Regel
5 einem Wildtyp-Stamm, erzeugt werden.

In einer Vielzahl von Ausgangsstämmen konnten SAM-Synthetase-Gene identifiziert werden. Bakterienstämme, die in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, lassen sich somit
10 vorzugsweise aus Ausgangsstämmen von prokaryontischen Organismen herstellen, die rekombinanten Verfahren zugänglich sind, die durch Fermentation kultivierbar sind und die in der Lage sind, SAM in das Kulturmedium zu sekretieren. Bevorzugt handelt es sich um Bakterienstämme aus der Familie Enterobacteriaceae, besonders bevorzugt der Gattung *Escherichia* insbesondere bevorzugt um Stämme der Art *Escherichia coli*. Dabei ist insbesondere die Verwendung eines *E. coli*-Stammes, der keine Fremdgene enthält, bevorzugt.
15

20 Eine im Vergleich zu Ausgangsstämmen verstärkte Aktivität der SAM-Synthetase kann grundsätzlich durch verschiedene Ansätze erreicht werden.

Entweder kann das Gen für die SAM-Synthetase in der Art verändert werden, dass das davon codierte Enzym eine höhere Aktivität aufweist als das Ausgangsenzym. Dies kann beispielsweise durch unspezifische oder durch gezielte Mutagenese des Gens für eine SAM-Synthetase erfolgen. Unspezifische Mutationen können zum Beispiel durch chemische Agentien (z.B. 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin, Ethylmethansulfonsäure u.ä.) und/oder
30 durch physikalische Methoden und/oder durch unter bestimmten Bedingungen durchgeführte PCR-Reaktionen und/oder durch Amplifikation der DNS in Mutatorstämmen (z.B. XL1-Red, Stratagene, Amsterdam, NL) erzeugt werden. Methoden zur Einführung von Mutationen an spezifischen Positionen innerhalb eines DNS-Fragmentes sind bekannt. Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung von SAM-Synthetasen mit im Vergleich zum Ausgangs-Enzym
35

gesteigerter Aktivität besteht in der Kombination verschiedener oben genannter Methoden.

Eine weitere Möglichkeit, eine im Vergleich zu Ausgangsstämmen verstärkte Aktivität der SAM-Synthetase zu erzielen, ist die Überexpression des für dieses Enzym codierenden Gens. Unter einer Überexpression ist im Sinne der vorliegenden Erfindung vorzugsweise zu verstehen, dass das SAM-Synthetase-Gen im Vergleich zum jeweiligen Ausgangsstamm, aus dem das SAM-Synthetase-Gen gewonnen wurde, mindestens um den Faktor 2, bevorzugt mindestens um den Faktor 5 vermehrt exprimiert wird.

Um eine Überexpression des *metK*-Gens in dem Stamm zu erreichen, kann die Kopienzahl des *metK*-Gens in einem Bakterienstamm erhöht sein und/oder es kann die Expression des *metK*-Gens, vorzugsweise durch geeignete Promotoren, gesteigert sein.

Die Erhöhung der Kopienzahl eines *metK*-Gens in einem Ausgangsstamm Zelle mit dem Fachmann bekannten Methoden erreicht werden. So kann zum Beispiel ein *metK*-Gen in einen Plasmid-Vektor mit mehrfacher Kopienzahl pro Zelle (z.B. pUC19, pBR322, pACYC184 für *Escherichia coli*) kloniert und in den Stamm eingebracht werden. Alternativ kann ein *metK*-Gen mehrfach ins Chromosom einer Zelle integriert werden. Als Integrationsverfahren können die bekannten Systeme mit temperenten Bakteriophagen, integrative Plasmide oder die Integration über homologe Rekombination genutzt werden.

Bevorzugt ist die Erhöhung der Kopienzahl durch Klonierung eines *metK*-Gens in einen Plasmid-Vektor unter Kontrolle eines Promotors. Besonders bevorzugt ist die Erhöhung der Kopienzahl in *Escherichia coli* durch Klonierung eines *metK*-Gens in ein pBR322-Derivat wie z. B. pJF118ut (abgeleitet von pJF118EH, Fürste et al. Gene, 119-131 (1986)).

Als Kontrollregion für die Expression eines plasmid-codierten *metK*-Gens kann die natürliche Promotor- und Operatorregion des

metK-Gens dienen, die verstärkte Expression eines *metK*-Gens kann jedoch insbesondere auch mittels anderer Promotoren erfolgen. Entsprechende Promotorsysteme, die entweder eine andauernde oder eine kontrollierte, induzierbare Expression des SAM-Synthetase-Gens ermöglichen wie beispielsweise in *Escherichia coli* der konstitutive GAPDH-Promotor des *gapA*-Gens oder die induzierbaren *lac*-, *tac*-, *trc*-, *lambda*-, *ara* oder *tet*-Promotoren, sind dem Fachmann bekannt. Solche Konstrukte können in an sich bekannter Weise auf Plasmiden oder chromosomal verwendet werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform für die Klonierung eines *metK*-Gens wird ein Plasmid verwendet, das bereits einen Promotor zur verstärkten Expression enthält, wie beispielsweise das induzierbare *tac*-Promotorsystem von *Escherichia coli*.

Des weiteren kann eine verstärkte Expression dadurch erreicht werden, daß Translationsstartsignale, wie z.B. die Ribosomenbindestelle oder das Startcodon des Gens, in optimierter Sequenz auf dem jeweiligen Konstrukt vorhanden sind, oder dass gemäß der "codon usage" seltene Codons gegen häufiger vorkommende Codons ausgetauscht werden, oder dass mRNA-Stabilisierungssequenzen optimiert werden.

Bevorzugt enthalten Bakterienstämme, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, ein Plasmid mit einem *metK*-Gen sowie den genannten Modifikationen der Regulationssignale.

Die Klonierung eines *metK*-Gens in einen Plasmid-Vektor erfolgt beispielsweise durch spezifische Amplifikation eines *metK*-Gens mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion unter Einsatz von spezifischen Primern, die das komplette *metK*-Gen erfassen, und anschließende Ligation mit Vektor-DNS-Fragmenten.

Die Effektivität eines Bakterienstammes zur erfindungsgemäßen fermentativen Produktion von SAM kann durch zusätzliche Maßnahmen verstärkt werden. Anstelle des Zusatzes von L-Methionin

oder D,L-Methionin kann die endogene Methionin-Synthese des im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Stammes gestärkt werden. Beispielsweise können zu diesem Zweck Stämme verwendet werden, in welchen das Gen *metJ*, welches für einen Repressor der Gene des Methionin- und SAM-Stoffwechsels codiert, nicht mehr exprimiert wird (JP2000139471A) oder Stämme, die eine verbesserte Methionin-Synthese zeigen, weil sie eine verbesserte Homoserin-Transsuccinylase besitzen (JP2000139471A, DE-A-10247437, DE-A-10249642).

Durch eine gängige Transformationsmethode (z.B. Elektroporation, CaCl_2 -Methode) werden die *metK*-haltigen Plasmide in einen Ausgangsstamm eingebracht und beispielsweise mittels Antibiotika-Resistenz auf plasmid-tragende Klone selektiert.

Die Kultivierung des Bakterienstammes zur erfindungsgemäßen Produktion von SAM erfolgt vorzugsweise in einem aus der Literatur bekannten Minimalsalzmedium.

Als Kohlenstoffquelle können prinzipiell alle verwertbaren Zucker, Zuckeralkohole, organische Säuren bzw. deren Salze, Stärkehydrolysate, Melasse oder andere Stoffe verwendet werden. Dabei werden bevorzugt Glucose oder Glycerin eingesetzt. Auch ist eine kombinierte Fütterung mehrerer verschiedener Kohlenstoffquellen möglich. Als Stickstoffquellen können Harnstoff, Ammoniak und seine Salze, Nitratsalze sowie andere N-Quellen dienen. Zu den möglichen Stickstoffquellen gehören auch komplexe Aminosäuregemische wie Hefeextrakt, Pepton, Malzextrakt, Sojapepton, Casamino-säuren, Maisquellwasser (Corn Steep Liquor) und NZ-Amine.

Des weiteren können dem Medium bestimmte Komponenten zugegeben werden wie Vitamine, Salze, Hefeextrakt, Aminosäuren und Spurenelemente, durch die das Zellwachstum verbessert wird.

Außerdem kann dem Medium L-Methionin als spezifische Vorstufe für die SAM-Synthese in einer Konzentration zwischen 0,05 und

25 g/l zugesetzt werden. Bevorzugt ist der Zusatz von L-Methionin in der Konzentration zwischen 1 und 5 g/l.

In einem besonders bevorzugten erfindungsgemäßen Verfahren wird dem Medium D,L-Methionin statt L-Methionin in einer Konzentration zwischen 0,05 und 25 g/l zugesetzt. Bevorzugt ist der Zusatz von D,L-Methionin in der Konzentration zwischen 1 und 5 g/l.

Die Inkubation des Stammes erfolgt vorzugsweise unter aeroben Kultivierungsbedingungen über einen Zeitraum von 16 - 150 h und im Bereich der für den jeweiligen Stamm optimalen Wachstumstemperatur.

Als optimaler Temperaturbereich werden 15 - 55 °C bevorzugt. Besonders bevorzugt ist eine Temperatur zwischen 30 und 37 °C.

Die Anzucht des Stammes kann im Schüttelkolben oder Fermenter erfolgen, wobei keine Beschränkungen hinsichtlich Volumen gegeben sind. Die Anzucht kann im Batch-Verfahren, im Fed-Batch- oder in einem kontinuierlichen Verfahren erfolgen.

Die Gewinnung von SAM aus dem Kulturmedium kann nach dem Fachmann bekannten Verfahren, wie Zentrifugation des Mediums zur Abtrennung der Zellen und anschließende chromatographische Reinigung, Komplexierung, Filtration wie zum Beispiel Querstromfiltration oder Fällung des Produktes erfolgen.

Der Nachweis und die Quantifizierung des im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten SAM erfolgt beispielsweise mittels Chromatographie (zum Beispiel HPLC).

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung. Der Bakterienstamm *Escherichia coli* W3110/pKP481, der für die Ausführung der Beispiele verwendet wurde, wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38142 Braunschweig) unter der Nummer DSM 15426 gemäß Budapester Vertrag hinterlegt.

Sämtliche eingesetzten molekularbiologischen Verfahren, wie
Polymerase-Ketten-Reaktion, Isolierung und Reinigung von DNS,
Modifikation von DNS durch Restriktionsenzyme, Klenow-Fragment
5 und Ligase, Transformation etc wurden in der dem Fachmann be-
kannten, in der Literatur beschriebenen oder von den jeweili-
gen Herstellern empfohlenen Art und Weise durchgeführt.

Beispiel 1: Konstruktion des Plasmids pKP481**A. Amplifizierung des *metK*-Gens**

Das *metK*-Gen aus *E. coli* wurde mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) unter Verwendung der Taq-DNA-Polymerase nach gängiger, dem Fachmann bekannter Praxis amplifiziert. Als Mat-
5 rize diente die chromosomale DNA des *E. coli*-Wildtypstammes W3110 (ATCC 27325). Als Primer wurden die Oligonukleotide *metK2* mit der Sequenz

5'-CCTTAATTAATGTCTGTTGTGGTTGGTGT-3' (SEQ ID No: 3)

10 und *metK4* mit der Sequenz

5'-GGAATTCTCTTTAGGAGGTATTAAATATG-3' (SEQ ID No: 4)

verwendet.

Das bei der PCR erhaltene DNA-Fragment mit einer Länge von ca. 1,2 kb wurde anschließend mittels eines DNA-Adsorptions-
15 säulchens des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt.

B. Klonierung des *metK*-Gens in den Vektor pJF118ut

In das PCR-Fragment wurde über Primer *metK4* eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *EcoRI* eingeführt. Das gerei-
20 nigte PCR-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuclease *EcoRI* unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen geschnitten, anschließend phosphoryliert, über ein Agarosegel aufgetrennt und dann mittels des QIAquick Gel Extraction Kits (Qia-
gen) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel isoliert.

Der aus dem Klonierungs- und Expressionsvektor pJF118EH (Fürste et al. Gene, 119-131 (1986)) abgeleitete Vektor pJF118ut enthält verschiedene genetische Elemente, die eine kontrollierte Expression eines beliebigen Gens erlauben. Es handelt sich dabei um einen Vektor mit einem von der pBR-
30 Plasmidfamilie abgeleiteten Replikationsursprung. Die Expression des klonierten Gens wird durch den *tac*-Promotor kontrolliert, durch den *lacIq*-Repressor unterdrückt und kann durch Lactose oder IPTG induziert werden.

Zur Klonierung des *metK*-Gens wurde der Vektor pJF118ut mit den
35 Restriktionsenzymen *EcoRI* und *PstI* unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen geschnitten. Der 3'-Überhang der *PstI*-Schnittstelle wurde mittels Klenow-Enzym auf dem Fachmann bekannte Art und Weise abgedaut. Das Plasmid wurde anschließend

durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase an den 5'-Enden dephosphoryliert und dann wie das PCR-Fragment mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gereinigt. Die Ligation des PCR-Fragments mit dem geschnittenen und dephosphorylierten Vektor erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung der T4-DNA-Ligase. Die Transformation von *E. coli*-Zellen des Stammes DH5 α mit dem Ligationsansatz wurde mittels Elektroporation in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Ampicillin-Agarplatten (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar, 20 mg/l Tetracyclin) ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die gewünschten Transformanten wurden nach einer Plasmidisolierung mittels eines QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) durch eine Restriktionsanalyse identifiziert und die Fehlerfreiheit durch Sequenzanalyse bestätigt.

Im dem auf diese Weise erhaltenen Plasmid pKP481 (Fig. 1) ist das *metK*-Gen unter Kontrolle des *tac*-Promotors.

Beispiel 2: Herstellung eines Produzenten von S-Adenosylmethionin

Das in Beispiel 1 beschriebene Plasmid pKP481 wurde mittels CaCl₂-Methode in den *E. coli*-Stamm W3110 (ATCC 27325) transformiert und nach Selektion auf LB-Agarplatten mit 20 mg/l Tetracyclin wurde das Plasmid aus einer der Transformanten reisoliert, mit Restriktionsendonucleasen gespalten und überprüft. Dieser Stamm wird als W3110/pKP481 bezeichnet und ist für die Produktion von SAM geeignet. Der Stamm wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38142 Braunschweig) unter der Nummer DSM XXXXX gemäß Budapester Vertrag hinterlegt.

Beispiel 3: Fermentative Produktion von S-Adenosylmethionin

A. Produktion von SAM

Für die fermentative Produktion von SAM wurde der Stamm W3110/pKP481 verwendet. Als Vergleich diente der Wildtyp-Stamm W3110 (ATCC 27325) ohne Plasmid, der unter denselben Bedingungen kultiviert wurde.

Für die Anzucht wurde folgendes Medium verwendet: für 1 l Medium: $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 0,0147 g, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,3 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 0,15 mg, H_3BO_3 2,5 mg, $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 0,7 mg, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ 0,25 mg, $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ 1,6 mg, $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,3 mg, KH_2PO_4 3,0 g, K_2HPO_4 12,0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, NaCl 0,6 g, $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,002 g, $\text{Na}_3\text{-Citrat} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 1g, Glucose 15 g, Trypton 1 g, He-feextrakt 0,5 g. Bei der Anzucht von W3110/pKP481 wurde dem Medium 20 µg/ml Tetracyclin zugesetzt. Wo angegeben (siehe Tabelle) enthielt das Medium außerdem einen Zusatz von 0,5 g/l L-Methionin oder 1 g/l D,L-Methionin.

Als Vorkultur für die Produktionsanzucht wurden zunächst 10 ml Medium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit dem jeweiligen Stamm beimpft und für 16 h bei 37 °C und 160 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Mit den auf diese Weise vorbereiteten Zellen wurden schließlich 50 ml desselben Mediums in einem 300 ml Erlenmeyerkolben auf eine OD_{600} (Absorption bei 600 nm) von 0,1 beimpft. Die Inkubation der Produktionskulturen erfolgte bei 37 °C und 160 rpm auf einem Schüttler für 48 h. Die Expression des SAM-Synthetase-Gens wurde durch Zugabe von 0,1 mM Isopropyl-β-thiogalaktosid (IPTG) bei einer OD_{600} von 0,6 induziert. Nach 24 h und 48 h wurden Proben entnommen und die Zellen durch Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt.

B. Quantifizierung des produzierten SAM

Das im Kulturüberstand enthaltene SAM wurde mittels HPLC quantifiziert. Dabei wurde eine Develosil RP-Aqueous C 30- Säule, 5 µm, 250 * 4,6 mm (käuflich erhältlich bei Phenomenex, Aschaffenburg, D) verwendet und 10 µL aufgebrachter Kulturüberstand mittels isokratischer Elution mit einem Fließmittel aus 3 ml 85%iger H_3PO_4 auf 1 l H_2O bei einer Flußrate von 0,5 ml/min bei Raumtemperatur aufgetrennt und mittels Diodenarray-Detektor bei einer Wellenlänge von 260 nm quantifiziert. Tabelle 1 zeigt die erzielten Gehalte von SAM im jeweiligen Kulturüberstand.

Tabelle 1:

| Stamm | S-Adenosylmethionin [mg/l] | | | | | |
|---------------|----------------------------|------|---------------------------------|------|---------------------------------|------|
| | Anzucht ohne Methionin | | Anzucht mit 0,5 g/l L-Methionin | | Anzucht mit 1 g/l D,L-Methionin | |
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| W3110 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| W3110/pK P481 | 3 | 12 | 61 | 71 | 34 | 31 |

Sequenzprotokoll

<110> Consortium fuer elektrochemische Industrie GmbH

<120> Prozess zur fermentativen Herstellung von
S-Adenosylmethionin

<130> Co10302

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 384

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Met Ala Lys His Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Ser Glu Gly His Pro
1 5 10 15

Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser Asp Ala Val Leu Asp Ala Ile Leu
20 25 30

Glu Gln Asp Pro Lys Ala Arg Val Ala Cys Glu Thr Tyr Val Lys Thr
35 40 45

Gly Met Val Leu Val Gly Gly Glu Ile Thr Thr Ser Ala Trp Val Asp
50 55 60

Ile Glu Glu Ile Thr Arg Asn Thr Val Arg Glu Ile Gly Tyr Val His
65 70 75 80

Ser Asp Met Gly Phe Asp Ala Asn Ser Cys Ala Val Leu Ser Ala Ile
85 90 95

Gly Lys Gln Ser Pro Asp Ile Asn Gln Gly Val Asp Arg Ala Asp Pro
100 105 110

Leu Glu Gln Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr
115 120 125

Asn Glu Thr Asp Val Leu Met Pro Ala Pro Ile Thr Tyr Ala His Arg
130 135 140

Leu Val Gln Arg Gln Ala Glu Val Arg Lys Asn Gly Thr Leu Pro Trp
145 150 155 160

Leu Arg Pro Asp Ala Lys Ser Gln Val Thr Phe Gln Tyr Asp Asp Gly
165 170 175

Lys Ile Val Gly Ile Asp Ala Val Val Leu Ser Thr Gln His Ser Glu
180 185 190

Glu Ile Asp Gln Lys Ser Leu Gln Glu Ala Val Met Glu Glu Ile Ile

| | 195 | 200 | 205 |
|----|---|-----|-------------|
| | Lys Pro Ile Leu Pro Ala Glu Trp Leu Thr Ser Ala Thr Lys Phe Phe | | |
| | 210 | 215 | 220 |
| 5 | Ile Asn Pro Thr Gly Arg Phe Val Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp Cys | | |
| | 225 | 230 | 235 240 |
| 10 | Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly Gly Met Ala | | |
| | | 245 | 250 255 |
| | Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val Asp | | |
| | | 260 | 265 270 |
| 15 | Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Tyr Val Ala Lys Asn Ile Val Ala | | |
| | | 275 | 280 285 |
| | Ala Gly Leu Ala Asp Arg Cys Glu Ile Gln Val Ser Tyr Ala Ile Gly | | |
| | | 290 | 295 300 |
| | Val Ala Glu Pro Thr Ser Ile Met Val Glu Thr Phe Gly Thr Glu Lys | | |
| | | 305 | 310 315 320 |
| 25 | Val Pro Ser Glu Gln Leu Thr Leu Leu Val Arg Glu Phe Phe Asp Leu | | |
| | | 325 | 330 335 |
| | Arg Pro Tyr Gly Leu Ile Gln Met Leu Asp Leu Leu His Pro Ile Tyr | | |
| | | 340 | 345 350 |
| 30 | Lys Glu Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu His Phe Pro Trp | | |
| | | 355 | 360 365 |
| | Glu Lys Thr Asp Lys Ala Gln Leu Leu Arg Asp Ala Ala Gly Leu Lys | | |
| | | 370 | 375 380 |

<210> 2
 <211> 1155
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

45 <220>
 <221> gene
 <222> (1)..(1152)
 <223> metK

50 <300>
 <301> Blattner, F. R.
 <302> The complete genome sequence of Escherichia coli K-12.
 <303> Science
 <304> 277
 55 <306> 1453-1474
 <307> 1997

<400> 2
 atggcaaaac accttttttac gtccgagtcg gtctctgaag ggcatacctga caaaattgct 60
 60 gaccaaattt ctgatgccgt tttagacgcg atcctcgaac aggatccgaa agcacgcggt 120

```

gcttgcgaaa cctacgtaaa aaccggcatg gttttagttg gcggcgaaat caccaccagc 180
gcctgggtag acatcgaaga gatcaccggt aacaccgttc gcgaaattgg ctatgtgcat 240
tccgacatgg gctttgacgc taactcctgt gcggttctga gcgctatcgg caaacagtct 300
cctgacatca accagggcgt tgaccgtgcc gatccgctgg aacagggcgc gggtgaccag 360
5 ggtctgatgt ttggctacgc aactaatgaa accgacgtgc tgatgccagc acctatcacc 420
tatgcacacc gtctggtaca gcgtcaggct gaagtgcgta aaaacggcac tctgccgtgg 480
ctgcgcccgg acgcgaaaaa ccagggtgact tttcagtatg acgacggcaa aatcgttgg 540
atcgatgctg tcgtgctttc cactcagcac tctgaagaga tcgaccagaa atcgctgcaa 600
gaagcggtaa tggaagagat catcaagcca attctgcccg ctgaatggct gacttctgcc 660
10 accaaaattct tcatcaaccc gaccggctcg ttcgttatcg gtggcccaat gggtgactgc 720
ggtctgactg gtcgtaaaat tatcgttgat acctacggcg gcatggcgcg tcacggtggc 780
ggtgcattct ctggtaaaga tccatcaaaa gtggaccgtt ccgcagccta cgcagcacgt 840
tatgtcgcga aaaacatcgt tgctgctggc ctggccgata gttgtgaaat tcaggtttcc 900
tacgcaatcg gcgtggctga accgacctcc atcatggtag aaactttcgg tactgagaaa 960
15 gtgccttctg aacaactgac cctgctggta cgtgagttct tcgacctgcg ccatacgg 1020
ctgattcaga tgctggatct gctgcacccg atctacaaag aaaccgcagc atacggtcac 1080
tttggtcgtg aacatttccc gtgggaaaaa accgacaaag cgcagctgct gcgcgatgct 1140
gccggtctga agtaa 1155

```

```

<210> 3
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

25 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid
metK2

```

```

<400> 3
30 ccttaattaa tgtctgttgt ggttggtgt 29

```

```

<210> 4
<211> 29
<212> DNA
35 <213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid
metK4

```

```

<400> 4
ggaattctct ttaggaggtg ttaaatatg 29

```

Patentansprüche

1. Verfahren zur fermentativen Produktion von S-Adenosylmethionin (SAM), dadurch gekennzeichnet, daß ein Bakterienstamm,
5 der aus einem Ausgangsstamm erhältlich ist, und eine im Vergleich zu dem Ausgangsstamm verstärkte Aktivität der SAM-Synthetase aufweist, in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei der Bakterienstamm SAM in das Kulturmedium ausscheidet und das SAM vom Kulturmedium abgetrennt wird.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Bakterienstamm ein Stamm aus der Familie Enterobacteriaceae, besonders bevorzugt der Gattung Escherichia, eingesetzt wird.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als SAM-Synthetase ein Protein umfassend die Sequenz SEQ ID NO: 1 oder eine funktionelle Variante mit einer Sequenzähnlichkeit zu SEQ ID NO: 1 größer 40 %, vorzugsweise größer 60 %, besonders bevorzugt größer 80 % eingesetzt wird.
- 20 4. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet, daß der Bakterienstamm in einem Minimalsalzmedium kultiviert wird.
- 25 5. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Kohlenstoffquelle Glucose oder Glycerin eingesetzt wird.
- 30 6. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Stickstoffquelle Harnstoff, Ammoniak oder seine Salze oder Nitratsalze eingesetzt wird.

7. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubation des Bakterienstammes unter aeroben Kultivierungsbedingungen über einen Zeitraum von 16 - 150 h und im Bereich der für den jeweiligen Bakterienstamm optimalen Wachstumstemperatur erfolgt.

8. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß dem Minimalsalzmedium L-Methionin beigesetzt wird, wobei ein Zusatz in einer Konzentration zwischen 0,05 und 25 g/l bevorzugt, und ein Zusatz in einer Konzentration zwischen 1 und 5 g/l besonders bevorzugt ist.

9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 7 dadurch gekennzeichnet, daß dem Minimalsalzmedium D,L-Methionin beigesetzt wird, wobei ein Zusatz in einer Konzentration zwischen 0,05 und 25 g/l bevorzugt, und ein Zusatz in einer Konzentration zwischen 1 und 5 g/l besonders bevorzugt ist.

10. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewinnung von SAM aus dem Kulturmedium mittels einer Zentrifugation des Kulturmediums und einer anschließenden chromatographische Reinigung, Komplexierung, Filtration wie zum Beispiel einer Querstromfiltration oder Fällung der SAM erfolgt.

Zusammenfassung

Verfahren zur fermentativen Herstellung von S-Adenosyl- methionin

5

Verfahren zur fermentativen Produktion von S-Adenosylmethionin (SAM), dadurch gekennzeichnet, daß ein Bakterienstamm, der aus einem Ausgangsstamm erhältlich ist, und eine im Vergleich zu dem Ausgangsstamm verstärkte Aktivität der SAM-Synthetase auf-
10 weist, in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei der Bakterienstamm SAM in das Kulturmedium ausscheidet und das SAM vom Kulturmedium abgetrennt wird.

Fig. 1: pKP481

